

# 油杉花粉个体发育中淀粉粒消长变化研究

李国平<sup>1,2</sup>, 黄群策<sup>1\*</sup>, 秦广雍<sup>1</sup>

(1. 郑州大学离子束生物工程省重点实验室, 河南 郑州 450052; 2. 莆田学院环境与生命科学系, 福建 莆田 351100)

**摘要:** 对油杉小孢子发生、花粉形成和花粉萌发过程中淀粉粒的消长动态作了详细观察。油杉于 1 月下旬形成花粉母细胞, 2 月上旬完成减数分裂形成小孢子, 小孢子经过连续 4 次有丝分裂后于 2 月底形成 5 细胞型的成熟花粉粒, 3 月初油杉开始传粉。油杉花粉个体发育中淀粉粒有明显的消长规律, 存在 2 次淀粉粒积累高峰: 一次是花粉母细胞进入减数分裂之前, 另一次是小孢子进行有丝分裂之前。花粉个体发育中淀粉粒的分布也具规律性: 在减 I 中期淀粉粒逐渐呈赤道区聚积, 在减 I 后期淀粉粒均匀地移向二子核周围, 最终淀粉粒平均分配在 4 个子细胞内; 花粉成熟发育期间, 淀粉粒聚集在核的周围, 散粉前一天成熟花粉中的淀粉粒全部消失, 初步鉴定认为, 淀粉粒转变为脂肪。在花粉萌发实验中, 淀粉粒重新在其花粉管中出现。初步认为, 成熟花粉粒中是否积累有淀粉粒并没有系统发育意义, 仅是一种传粉生物学特性之一。

**关键词:** 油杉; 小孢子发生; 花粉发育; 淀粉粒; 消长规律

中图分类号: S791.254 文献标识码: A

## Studies on Regularity of Accumulation and Disappearance of Starch Grains in Microsporogenesis and Malegametogenesis of *Keteleeria fortunei*

LI Guoping<sup>1,2</sup>, HUANG Qurce<sup>1\*</sup>, QIN Guang-yong<sup>1</sup>

(1. Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China;

2. Department of Environment and Life Science, Putian University, Putian 351100, Fujian, China)

**Abstract:** The paper dealt with detailed studies on regularity of accumulation and disappearance of starch grains in microsporogenesis, pollen development and pollen germination of *Keteleeria fortunei* (Murr.) Carr.. The microspore mother cells (MMC) were formed in late January, 2003 and then carried out meiosis from Jan. 26 to Feb. 5. Microspores were released from tetrads on Feb. 9. Through four times of continuous mitosis, microspore developed into five-celled pollen grain in later Feb.. The mature pollen consisted of two prothallial cell, a sterile cell, a spermatogenous cell and a tube cell. The pollination occurred in early Mar., lasting about 8 days. The study indicated that starch grains accumulated and disappeared regularly at different phase during pollen development. It was observed that there were two dominant peak accumulation of starch grains. One occurred just before the meiosis of the MMC taking place and another appeared before the microspore beginning mitosis. The amount of starch grains gradually decreased with the division of the cells. And it was showed that the distribution of starch grains changed regularly with the rhythm of pollen development. The starch grains aggregated gradually toward the equatorial region during the metaphase I and then moved to the daughter nucleus during anaphase I, and finally distributed to the four daughter cells equally when the meiosis of the MMC ended. During the maturation of pollen, the starch grains aggregated mainly around the nucleus. All of them disap-

收稿日期: 2004-12-29

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2001BA302B); 福建省教育厅科研项目(JA02268)

作者简介: 李国平(1966—), 男, 副教授, 博士生, 主要从事离子束植物生物技术研究。

\* 通讯作者。

致谢: 本文研究过程中得到中国科学院植物研究所陈祖镗研究员的热情鼓励和悉心指导; 莆田学院生物技术专业 2000 级谢国春、王游志同学协助材料采集固定, 在此一并表示诚挚的感谢!

peared before pollination. The Sudan III test indicated that they changed into fat. But they appeared again in the pollen tubes after pollen grains were cultured *in vitro* and germinated. It was supposed that the reserve of starch grains in mature pollen was in line with ecophysiological adaptations such as the respective pollination syndrome rather than systematics.

**Key words:** *Keteleeria fortunei*; microsporogenesis; pollen development; starch grain; regularity of accumulation and disappearance

花粉在植物生殖过程中起着极其重要的作用, 探讨花粉个体发育几乎成为各国科学家研究的热点<sup>[1]</sup>。花粉个体发育过程中所需营养物质由绒毡层提供, 这些营养物质可能很快被代谢消耗, 也可能以一定的方式暂时贮存, 淀粉粒是常见的营养贮存方式之一。花粉中碳水化合物的贮存类型与花粉的寿命和活力有关, 且具一定的系统发育意义<sup>[2~5]</sup>。淀粉粒生物合成的异常可导致花粉的败育<sup>[6,7]</sup>。所以, 研究花粉发育过程中淀粉粒的消长规律与分布具有重要的意义。

中国是世界上裸子植物最多的国家, 具有种类丰富、起源古老、子遗成分和特有成分繁多等特点。我国在裸子植物特有属种的胚胎学及其系统分类学等方面的研究是独具特色的<sup>[8]</sup>。有关马尾松(*Pinus massoniana* Lamb.)、杉木(*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook)、水松(*Glyptostrobus pensilis* (Staunt.) Koch)、黑松(*Pinus thunbergii* Parl.)、油松(*Pinus tabulaeformis* Carr.)等花粉中淀粉粒的消长变化已有报道<sup>[9~13]</sup>, 而油杉(*Keteleeria fortunei* (Murr.) Carr.)为我国特有树种, 是古老的子遗植物<sup>[14,15]</sup>, 尚未见任何油杉胚胎学研究方面的报道。本文较详细报道了油杉花粉个体发育过程中淀粉粒的消长动态变化, 为其有性繁殖、育种研究提供基础参考资料。

## 1 材料和方法

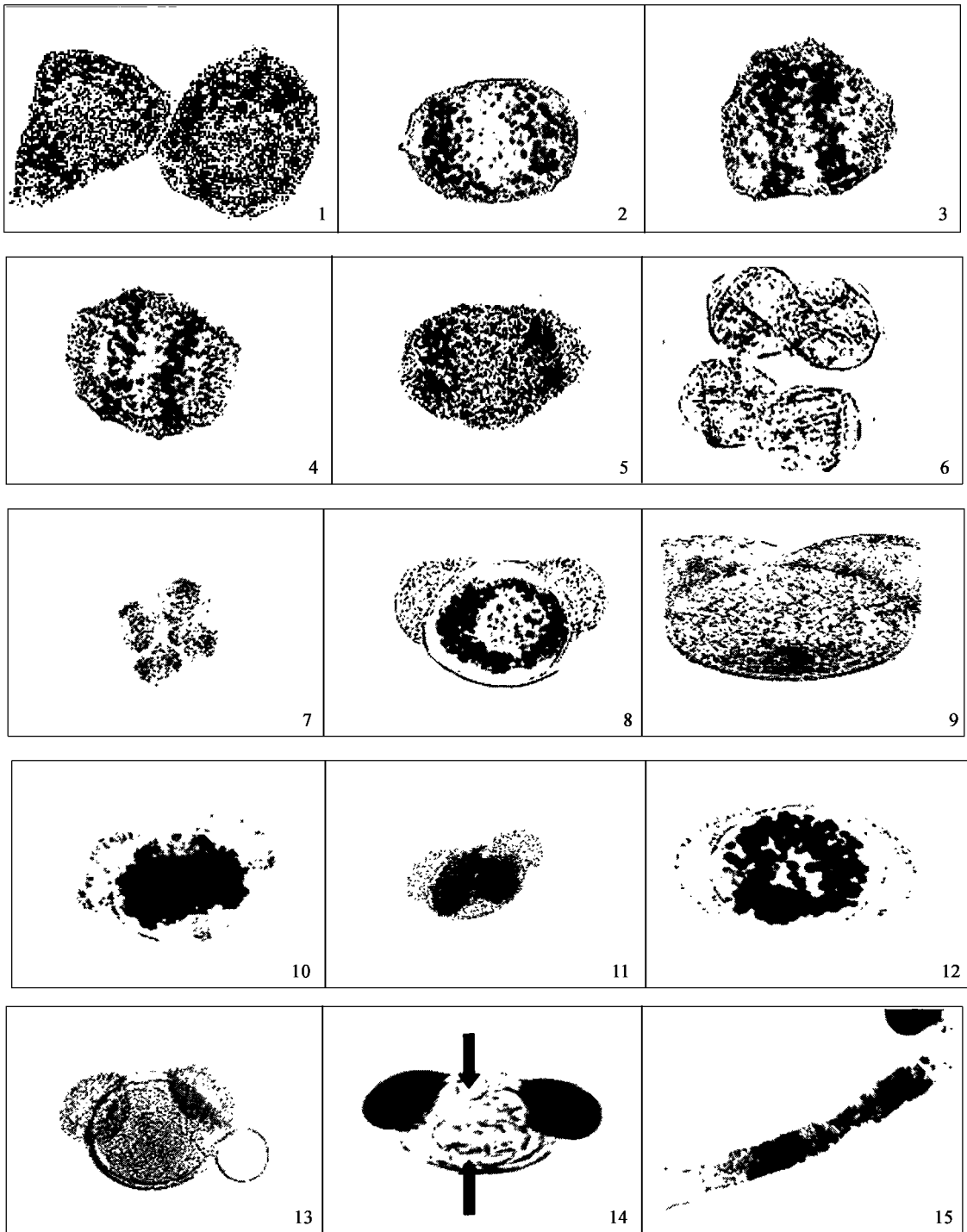
实验材料取自福建省莆田市市郊广化寺旁树龄约20 a的油杉野生植株, 采集观察以其中一棵为主, 其它植株作辅助观察。采样时间2003年1月14日至2003年3月10日, 每日上午1次, 每次采20~30个小孢子叶球序, 均取自树冠中上部枝条。仔细剥去外部包裹的鳞片, 迅速固定于卡诺液中, 24 h后换至70%酒精, 贮存于4℃冰箱中。醋酸洋红染色压片法鉴定花粉个体发育时期; KFI液染色法检查花粉个体发育中淀粉粒消长变化; 苏丹III染色法鉴定脂肪。成熟花粉萌发培养基为10%蔗糖+100 mg·L<sup>-1</sup>硼酸+100 mg·L<sup>-1</sup>氯化钙, 25℃下悬滴培养48 h。所有制片均在Olympus BX51型显微镜下进行观

察并摄像。

## 2 结果与分析

油杉于1月后旬形成花粉母细胞, 2月上旬完成减数分裂并形成小孢子。油杉减数分裂期从开始至结束持续约11 d。2月9日后, 四分体的胼胝质解体, 小孢子从四分体中释放出来, 小孢子经过连续4次有丝分裂后, 于2月底形成5-细胞型的成熟花粉粒, 包含2个原叶细胞、1个管细胞、1个精原细胞和1个不育细胞。从小孢子至花粉成熟约经18 d的生长发育期, 3月初油杉开始传粉, 传粉约持续8 d。油杉成熟花粉萌发率不高, 在10%蔗糖+100 mg·L<sup>-1</sup>硼酸+100 mg·L<sup>-1</sup>氯化钙培养基中花粉萌发率平均为31.6%。

油杉花粉个体发育中淀粉粒消长有明显的变化规律(图版): 多边形的造孢细胞内无明显的淀粉粒(图版, 1), 当造孢细胞转变为圆球形或椭圆形的花粉母细胞时, 开始积累淀粉粒。初期, 花粉母细胞的淀粉粒少、颗粒小, 并无一定的分布规律, 当花粉母细胞即将进入减数分裂时积累较多的淀粉粒。前期I, 母细胞中的淀粉粒主要分布在细胞核周围(图版, 2); 在减I中期, 淀粉粒逐渐向中期I形成赤道板的赤道区处聚集, 淀粉粒几乎充满赤道区(图版, 3); 在减I后期, 淀粉粒均匀地移向二子核周围(图版, 4); 减II中期至末期, 淀粉粒逐渐向左右分开, 平均分配在四个子细胞内, 在此过程中淀粉粒的颗粒逐渐变小(图版, 5)。油杉花粉个体发育中四分体时期约有3 d, 在四分体初期子细胞内几无淀粉粒(图版, 6), 在四分体后期子细胞自身也积累少量淀粉粒, 主要分布于细胞壁内侧(图版, 7), 但这些淀粉粒很快被消耗。刚从四分体中释放出来的小孢子中仅含有少量淀粉粒, 颗粒很小, 随着花粉生长发育, 体积增大, 开始又一次积累淀粉粒, 淀粉粒的数量和颗粒逐渐增加变大, 小孢子即将进行第一次有丝分裂前, 淀粉粒积累达到高峰, 分布于细胞核周围(图版, 8)。小孢子连续进行4次有丝分裂, 形成5-细胞型成熟花粉粒, 在此过程中形成的胚性细胞、精子器原始细



图版 油杉花粉个体发育中淀粉粒消长变化

图版说明: 图 1. 多边形的造孢细胞转变为圆球形或椭圆形的花粉母细胞时, 开始在细胞核周围积累淀粉粒( $\times 640$ ); 图 2. 花粉母细胞进行减数分裂之前淀粉粒积累达到一个高峰( $\times 640$ ); 图 3. 在减 I 中期, 淀粉粒聚集于赤道区处( $\times 640$ ); 图 4. 在减 I 后期, 淀粉粒开始均匀地向二子核( $\times 640$ ); 图 5. 减 II 后期至末期, 淀粉粒逐渐向左右分开, 平均分配给四个子核( $\times 640$ ); 图 6. 四分体初期, 四个子细胞内几无淀粉粒( $\times 640$ ); 图 7. 四分体后期, 亦见淀粉粒的积累( $\times 370$ ); 图 8. 小孢子单核居中期淀粉粒积累达到另一个高峰( $\times 438$ ); 图 9. 小孢子进行第一次有丝分裂, 第一原叶细胞内不具淀粉粒, 而胚性细胞具丰富淀粉粒(醋酸洋红染色)( $\times 640$ ); 图 10~ 11. 示原叶细胞内不具淀粉粒 图 10( $\times 438$ ), 图 11( $\times 370$ ); 图 12. 刚形成的成熟花粉粒具丰富淀粉粒, 积累于管细胞内( $\times 438$ ); 图 13. 散粉前一天成熟花粉内的淀粉粒突然全部消失( $\times 438$ ); 图 14. 传粉期成熟花粉粒(苏丹 III 染色), 箭头示花粉粒内大小不同的油滴( $\times 438$ ); 图 15. 花粉管中聚集大量淀粉粒( $\times 438$ ).

胞、管细胞中都具有淀粉粒, 而2个原叶细胞、生殖细胞、精原细胞(体细胞)和不育细胞(柄细胞)中均无淀粉粒(图版, 9~11)。花粉成熟发育期间, 淀粉粒聚集在核的周围。成熟花粉粒中管细胞占据大部分体积, 含有大量淀粉粒(图版, 12), 但在散粉前一天其中的淀粉粒突然全部消失(图版, 13), 经用苏丹II染色初步鉴定表明: 淀粉粒全部转变为脂肪(图版, 14), 散出的成熟花粉中不具淀粉粒。在花粉萌发实验中, 淀粉粒重新在其花粉管中出现(图版, 15)。

### 3 结论与讨论

油杉花粉个体发育中淀粉粒有明显的消长规律, 存在两次淀粉粒积累高峰, 一次是花粉母细胞进入减数分裂之前, 另一次是小孢子进行有丝分裂之前。从淀粉粒的积累时期可以看出: 淀粉粒的变化与花粉个体发育密切相关。第1次淀粉粒积累是为花粉母细胞的减数分裂作好物质准备, 所积累的淀粉粒在减数分裂过程中大部分被花粉粒迅速转化、吸收和利用, 刚从四分体中释放出来的小孢子中仅含有少量淀粉粒, 颗粒很小。第2次淀粉粒积累为花粉的成熟过程储备能量, 但在花粉成熟过程中, 花粉粒内始终存在丰富的淀粉粒, 这与花粉母细胞减数分裂过程中淀粉粒逐渐被消耗减少的情况有所不同, 其原因可能是花粉成熟所经历时间较长, 有足够的时间积累营养。

在四分体后期亦见子细胞自身积累少量淀粉粒, 但这些淀粉粒很快被消耗, 所以并未出现淀粉粒的积累高峰。在四分体时期, 气囊开始发育, 细胞壁开始增厚, 细胞体积迅速增大, 这些发育过程需要大量的营养供应, 从绒毡层转运来的营养物质被迅速地代谢转化成其它物质, 仅少量富余营养以淀粉粒形式积累。肖德兴等<sup>[12]</sup>认为淀粉粒的动态变化与新细胞壁的形成有关; 吕世友等<sup>[16]</sup>在综述文献中指出, 淀粉粒的动态变化与细胞器的变化有相似之处, 它们与花粉发育中细胞质重组和新细胞壁的形成有关; 作者也观察到在四分体时期, 淀粉粒贴壁分布, 可能为气囊和细胞壁的发育直接提供物质支持。

在花粉成熟过程中, 在小孢子有丝分裂所形成的胚性细胞、精子器原始细胞、管细胞中有淀粉粒的形成, 而2个原叶细胞、生殖细胞、精原细胞(体细胞)和不育细胞(柄细胞)中均无淀粉粒, 这从一侧面说明了小孢子所进行的4次有丝分裂为不对称分

裂。小孢子在进入有丝分裂之前, 细胞核位移建立起由近极面到远极面的轴向极性。产生极性是花粉发育中的普遍现象, 也很可能是大多数植物小孢子不对称分裂的前提条件之一<sup>[16]</sup>。

油杉成熟花粉粒中管细胞中含有大量淀粉粒, 但在散粉前一天淀粉粒突然全部消失, 经用苏丹III染色初步鉴定表明: 淀粉粒全部转变为脂肪, 这是油杉花粉个体发育过程中淀粉粒消长变化的一个显著特征。脂肪是由碳水化合物转化而来的, 正如在油料种子成熟过程中, 首先积累可溶性糖和淀粉, 但其含量随着种子发育而下降, 而同时脂肪含量开始逐渐增加。在植物细胞中, 白色体和圆球体都能积聚脂类物质, 发育成油滴。油杉成熟花粉中脂肪形成的生理生化过程有待以后进一步研究。作者认为, 油杉散粉前花粉粒中的淀粉粒转变为脂肪类物质, 可稳定花粉含水量, 避免传粉后因失水干瘪而丧失活力, 从而提高花粉粒的寿命; 另一方面, 油杉为风媒传粉, 贮存物质为脂肪类的花粉可能比贮存物质为淀粉粒的花粉更适于在空中飞翔。总之, 油杉散粉前花粉粒中的淀粉粒转变为脂肪类物质有一定的传粉生物学意义, 可能是对传粉的一种适应性特征。

据观察, 水松花粉发育过程中也有淀粉粒积累, 但在形成管细胞和生殖细胞后全部消失<sup>[12]</sup>; 杉木成熟花粉中也仅有极少量的淀粉粒<sup>[9]</sup>; 而马尾松的成熟花粉中积累了大量淀粉粒<sup>[10]</sup>。孔冬梅等<sup>[13]</sup>对油松花粉中的淀粉粒动态分布作了详细观察, 认为油松成熟花粉有大量淀粉粒, 但淀粉粒在散粉前转移到气囊。据 Baker<sup>[17]</sup>报道, 杉科植物成熟花粉中仅含有胼胝质, 松科植物不仅含有胼胝质并含有较多的淀粉粒。油杉属于松科植物, 但处于传粉期的油杉花粉中并无淀粉粒存在, 这一观察结果与 Baker 的结论不一致。作者初步认为, 花粉个体发育中淀粉粒的动态分布及成熟花粉粒中是否积累淀粉粒并没有系统发育意义, 而可能与物种的分布环境有关, 是一种传粉生物学特性之一。Bellani L 等<sup>[2]</sup>对 901 种植物花粉中贮存的碳水化合物类型进行详细研究后认为, 只有少数科的植物花粉中的贮存物质类型是一致的, 花粉贮存物质的类型大多与植物的生态生理适应性有关, 特别是与传粉生物学特性有关。飞散花粉中所含的可溶性碳水化合物可降低细胞渗透势, 减少水分丧失, 且对细胞膜系统有保护作用, 所以, 花粉中可溶性碳水化合物的浓度与花粉的寿命有关<sup>[18]</sup>。

总之,淀粉粒作为花粉发育过程中营养物质提供者和营养储备形式之一,其消长动态变化与花粉个体发育期密切相关。对淀粉粒消长规律的研究有助于探索花粉发育的内在机制,为油杉的林业生产和生物多样性保护提供重要的科学依据。

#### 参考文献:

- [1] 陈祖铿. 花粉的个体发育[J]. 植物杂志, 1989(6): 2~ 3
- [2] Bellani L, Franchi G G, Nepi M, et al. Types of carbohydrate reserves in pollen localization, systematic distribution and ecophysiological significance[J]. Flora, 1996, 191 (2): 143~ 159
- [3] Pacini E. Types and meaning of pollen carbohydrate reserves[J]. Sex Plant Reprod, 1996, 9: 362~ 366
- [4] Franchi G G, Nepi M, Dafni A, et al. Partially hydrated pollen: taxonomic distribution, ecological and evolutionary significance[J]. Plant Syst Evol, 2002, 234 (F4): 211~ 227
- [5] Speranza A, Calzoni G L, Pacini E. Occurrence of mono or disaccharides and polysaccharide reserves in mature pollen grains[J]. Sexual Plant Reproduction, 1997, 10 (2): 110~ 115
- [6] Datta R, Chamuso K C, Chourey P S. Starch biosynthesis during pollen maturation is associated with altered patterns of gene expression in maize [J]. Plant Physiology, 2002, 130 (4): 1645~ 1656
- [7] Datta R, Chourey P S, Pring D R, et al. Gene expression analysis of sucrose starch metabolism during pollen maturation in cytoplasmic male sterile and fertile lines of sorghum [J]. Sexual Plant Reproduction, 2001, 14 (3): 127~ 134
- [8] Hu S Y. Development of plant embryology in China[J]. Acta Botanica Sinica, 2002, 44(9): 1022~ 1042
- [9] 肖德兴. 杉木小孢子发生和花粉发育中的淀粉粒和胼胝体[J]. 江西农业大学学报, 1990, 12(4): 73~ 78
- [10] 肖德兴. 马尾松花粉中的淀粉粒和胼胝体[J]. 实验生物学报, 1994, 27(1): 37~ 43
- [11] 肖德兴, 陈祖铿. 黑松花粉个体发育的研究[J]. 植物学报, 1990, 32(11): 847~ 851
- [12] 肖德兴. 水松花粉中的淀粉粒和胼胝体[J]. 江西农业大学学报, 1997, 19(3): 107~ 110
- [13] 孔冬梅, 常培英, 程芳琴. 油松花粉中的淀粉粒[J]. 江西农业大学学报, 2001, 21(1): 38~ 41
- [14] 郑万钧, 傅立国. 中国植物志(第七卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1978: 168~ 196
- [15] 林来官. 福建植物志(第一卷)[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1982: 275~ 277
- [16] 吕世友, 李彦舫, 陈祖铿, 等. 花粉发育的研究进展[J]. 植物学通报, 2001, 18(3): 340~ 346
- [17] Baker H G, Baker I. Some evolutionary and taxonomic implications of variation in the chemical composition of pollen[A]. In: Mulcahy D L, Ottaviano E. Pollen biology and implications in plant breeding[M]. New York: Elsevier, 1983: 43~ 52
- [18] Nepi M, Franchi G G, Pacini E. Pollen hydration status at dispersal: cytophysiological features and strategies[J]. Protoplasma, 2001, 216 (3-4): 171~ 180